



# RESOLVOSIL BSA-7

**Bitte beachten:** Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können.

Mit der Säule RESOLVOSIL BSA-7 haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL<sup>®</sup> erworben. Das kovalent am Kieselgel gebundene Protein BSA ist naturgemäß empfindlich gegen Denaturierung. Die Standzeit ist somit von den durchgeführten Messungen und der Behandlung der Säule bestimmt. Daher sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanweisung vertraut machen. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Säule wurde speziell für die chromatographische Trennung optischer Isomere entwickelt und kann erfolgreich sowohl für optische Auflösung als auch zur Bestimmung der optischen Reinheit eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der analytischen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Analysensystems, also Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Analysenbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Aufgabenstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service / technische Produktberatung.

**Inhaltsübersicht**

- Sicherheitshinweise
- Beschreibung der Säule
- Applikation
- Installation
- Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung

**Sicherheitshinweise**

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Eluentensysteme (z. B. Propanol) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z. B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (insbesondere das Öffnen der Säule und Freilegen des Säulenbettes) Folgeschäden auftreten.

**Beschreibung der Säule**

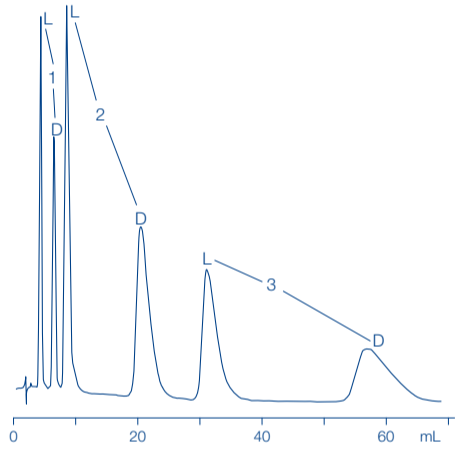
Die stationäre Phase der RESOLVOSIL BSA-7 Säule besteht aus weitporigem, sphärischen Kieselgel, an das Rinderserumalbumin (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA) kovalent gebunden ist. Die chirale Erkennung beruht auf der selektiven Wechselwirkung zwischen dem Protein BSA und niedermolekularen Verbindungen. Auch haben hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wechselwirkungen von polaren Gruppen und sterische Effekte Einfluss auf den Trennmechanismus. Die Säule lässt sich gut zur chiralen Analyse von Aminosäure-Derivaten, aromatischen Aminosäuren, aromatischen Sulfoxiden, Barbituraten, Benzodiazepinonen, Benzoin und Benzoin-Derivaten,  $\beta$ -Blockern sowie Cumarin-Derivaten und auch zur Untersuchung stereoselektiver mikrobieller und enzymatischer Reaktionen einsetzen. Die wichtigen Vorteile der RESOLVOSIL Säule sind ihre hohe Trennschärfe sowie die Leichtigkeit, mit der durch geringfügige Veränderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase die Retention beeinflusst werden kann. Dieses bewirkt eine hohe Flexibilität des chromatographischen Systems, da die optische Auflösung dem jeweiligen Trennproblem optimal angepasst werden kann.

**Applikation**

**Enantiomertrennung von N-Benzoyl-D,L-Aminosäuren**

**Säule:** EC 150/4 RESOLVOSIL BSA-7  
**Eluent:** 50 mmol/L Phosphatpuffer, pH 6,5 + 1% 1-Propanol  
**Flussrate:** 0,70 mL/min  
**Detektion:** UV, 225 nm

- Peaks:**  
 1. Serin  
 2. Alanin  
 3. Phenylalanin



S. Allenmark et al. in „Affinity Chromatography and Biological Recognition“ (I. Chaiken, M. Wilchek and I. Parikh, eds.), Acad. Press New York (1983), 259–260

MN Appl. Nr. 105450

Weitere Anwendungsbeispiele für RESOLVOSIL Säulen finden Sie in unserer Applikationsdatenbank im Internet unter [www.mn-net.com/apps](http://www.mn-net.com/apps).

**Installation**

Der Einbau der HPLC-Säulen sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Sie werden mit gerätetypischen 1/16" Kapillaren und Verschraubungen angeschlossen.

**Vorsäulen**

Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule sollten immer Vorsäulen verwendet werden. Die Filterelemente und das Sorbens der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Der Anschluss der Vorsäule an die Trennsäule erfolgt mittels Vorsäulenhalter (siehe hierzu [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) oder MN Chromatographie-Katalog). Ein Wechsel der Vorsäule ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendrucks und/oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

**Probe**

Die Probe wird in der Regel im Eluenten gelöst. Wässrige Proben können direkt auf die Säule gegeben werden. Jedoch sollten sie vor der Aufgabe durch Verwendung eines Spritzenvorsatzfilter (z. B. CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PET, 0,45  $\mu$ m, 25 mm, REF 729220) gereinigt werden. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst klein gewählt werden. Eine gute Auflösung wird bei Probenkonzentrationen unter 0,2  $\mu$ mol pro Injektion erreicht.

**Eluent**

Die RESOLVOSIL BSA-7 Säule wird mit dem Eluenten 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol ausgeliefert. Sie kann mit wässrigen Puffersystemen im pH-Bereich von 5 bis 8 betrieben werden. Phosphat- und Boratpuffer sind besonders geeignet. Extreme pH-Werte (< 5 oder > 8) sollten vermieden werden. Retention und optische Auflösung können durch Änderung des pH-Wertes, der Pufferstärke (0,01–0,2 mol/L) und/oder der Oberflächenspannung durch kleine Mengen an 1-Propanol (0–5%) als Lösemittelzusatz beeinflusst werden. Bereits 1–2% 1-Propanol bewirken eine deutliche Reduzierung der Retention. Mehr als 5% sind nicht empfehlenswert. Der Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Retention lässt sich nicht allgemein vorhersagen. In gewissem Maße verhält sich die Säule wie eine RP-Phase, aber bitte beachten Sie, dass keine mobilen Phasen mit Acetonitril oder Methanol verwendet werden dürfen, da diese Lösemittel das Protein denaturieren. Die Eluenten sollten stets durch einen 0,2–0,45  $\mu$ m Membranfilter filtriert und entgast werden.

**Flussrate und Druck**

Die Flussrate (empfohlen: 0,5–1,5 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den Rückdruck begrenzt, der den Maximalwert von 300 bar nicht überschreiten sollte. Wir empfehlen den Rückdruck regelmäßig zu überprüfen. Wenn bei der Benutzung der Säule unter normalen Flussraten ein erhöhter Rückdruck resultiert, deutet dieses im Allgemeinen auf eine Verunreinigung des Packungsmaterials hin, die entfernt werden muss (siehe Behebung möglicher Fehler).

**Temperatur**

Säulentemperaturen von 10–40 °C werden empfohlen. Sie sollten allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen, damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist. Durch Variation dieser Größe wird die Retentionszeit, der Rückdruck und insbesondere die Peakform beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

**Detektion**

Mit den Säulen können UV-, Fluoreszenz-, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können Nachsäulenderivatisierungen mit einem geeigneten Detektor für die Reaktionsprodukte eingesetzt werden.

**Equilibrierung**

Bevor Proben gemessen werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden. Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

**Säulenaufbewahrung**

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol und die Kühlung im Kühlschrank empfohlen. Außerdem empfehlen wir dem Aufbewahrungseluenten 0,01% Natriumazid zu zugeben, um ein mögliches Bakterienwachstum zu vermeiden. Während einer chromatographischen Trennung sollte dem Eluenten kein Natriumazid zugegeben werden. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschraubungen fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit ca. 10 Säulenvolumina des Lagereluenten und einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min.

**Behebung möglicher Fehler**

Das folgende Schema beschreibt typische Symptome eines Leistungsverlustes und deren Ursache. Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. Säulen auf Kieselgelbasis sind naturgemäß sehr robust und halten bei korrekter Pflege und Behandlung ihre Trennleistung über lange Zeiträume aufrecht. Erfahrungsgemäß sind Säulenausfälle meist auf eine Verunreinigung des Sorbensbettes zurückzuführen. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbereitung verhindern meist diese Probleme. Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
<b>Basislinien-Drift</b> · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren  frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatisierung
<b>Breite Peaks</b> · Mischung und/oder Diffusion vor/hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
<b>Peaküberlagerung; zu schnelle Elution</b> zu schnelle Elution und/oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Elutionskraft des Eluenten zu hoch	entsprechenden Parameter optimieren  Eluentensystem optimieren
<b>Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung</b> Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Denaturierung des Proteins	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens niemals Acetonitril oder Methanol verwenden; Propanolzusatz unter 5% / Säulenaustausch
<b>Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck</b> Verunreinigung durch: · Belegung der Sorbensoberfläche mit organischen Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Proben · Denaturierung des Proteins	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung) niemals Acetonitril oder Methanol verwenden; Propanolzusatz unter 5% / Säulenaustausch
<b>Doppelpeaks (Totvolumen):</b> · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / Austausch der Verschraubungen pH-Stabilität der Säule beachten / Säulenaustausch

**Säulenregenerierung**

In einigen Fällen kann die Trennleistung der Säule wiederhergestellt werden, indem man die Verunreinigungen vom Sorbensbett entfernt bzw. die Phase regeneriert. Allerdings ist es wichtig, die Ursache der Verunreinigung zu lokalisieren, bevor die Säule wieder für die Analyse von Proben verwendet wird.

- Frischen Eluenten zubereiten:** Manchmal wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45  $\mu$ m Membran filtriert und entgast werden.
- Reinigen des Sorbens:** Zur Entfernung von Verunreinigungen und zur Regenerierung der Phase spülen Sie die Säule mit reinem Wasser bei einer Flussrate von 0,5 mL/min für ca. 4–5 h. Danach stellen Sie auf die ursprünglichen Arbeits- oder auf Lagerbedingungen um. Ein entsprechender Hinweis für die erfolgreiche Reinigung ist die Konstanz der Basislinie. Beim isokratischen Lauf mit konstanter Temperatur sollte innerhalb einer Laufzeit von 5 min nicht mehr als 2–3 mAU Drift beobachtet werden.
- Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Bestimmte organische Verunreinigungen lassen sich durch die beschriebenen Reinigungsmethoden nicht immer entfernen. Auch Totvolumen durch Kompression des Säulenbettes oder eine Denaturierung des Proteins lassen sich i. d. R. nicht beheben, so dass die Säule ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

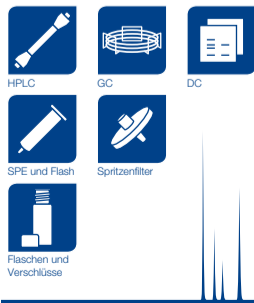
Länge [mm]	Innendurchmesser [mm]:	Säulenvolumen [mL]			
		2	3	4	4,6
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

**Zusammenfassung**

Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:

- Als Eluenten werden wässrige Puffersysteme im pH-Bereich von 5 bis 8 empfohlen (z. B. Phosphat- und Boratpuffer). Der Zusatz von bis zu 5% 1-Propanol ist möglich. Niemals dürfen Zusätze von Acetonitril oder Methanol verwendet werden! Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45  $\mu$ m Membran filtriert und entgast werden.
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45  $\mu$ m CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PET Spritzenfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate beträgt 0,5–1,5 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 300 bar bleibt.
- Lagern Sie die Säule in 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol in einem Kühlschrank und fügen Sie 0,01% Natriumazid zum Eluenten hinzu.
- Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p. A. Qualität und Lösemittel in HPLC-Qualität. Verwerfen Sie alle Lösungen, die Anzeichen von Bakterienwachstum zeigen.

Informieren Sie sich über alle MACHEREY-NAGEL Chromatographie-Produkte: [www.mn-net.com/chromatographie](http://www.mn-net.com/chromatographie)



... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: [ChromaAppDB.mn-net.com](http://ChromaAppDB.mn-net.com)



# RESOLVOSIL BSA-7

**Note:** All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column.

The RESOLVOSIL BSA-7 column is a quality product based on the robust silica NUCLEOSIL®. The protein BSA covalently bonded to silica is naturally sensible for denaturation. Thus, the lifetime of the column highly depends on the measurement and the treatment of the column. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this instruction leaflet. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. This column has been specifically developed for the chromatographic separation of optical isomers and demonstrated to be a successful tool for optical resolution as well as for determination of the enantiomeric purity. All HPLC columns must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) has to be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) must be adapted to the analytical task. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this leaflet, please call our service / technical support.

**Table of contents**

- Safety indication
- Description of the column
- Application note
- Installation
- Guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract

**Safety indication**

Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., propanol) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and/or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

**Description of the column**

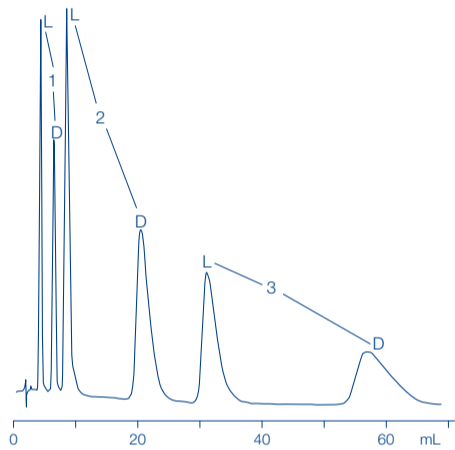
The stationary phase RESOLVOSIL BSA-7 is based on bovine serum albumin (BSA) covalently bonded to wide-pore spherical silica. Chiral recognition is based on the selective interaction between the protein BSA and low molecular compounds. Also hydrophobic interaction as well as interaction from polar groups and sterical effects influence the separation mechanism. The column has proven useful for chiral analysis of amino acid derivatives, aromatic amino acids, aromatic sulfoxides, barbiturates, benzodiazepinones, benzoin and benzoin derivatives, β-blockers as well as coumarin derivatives and also for monitoring stereoselective microbial and enzymatic conversions. The main advantages of the RESOLVOSIL column are extremely high selectivity and easy regulation of retention by small changes in the mobile phase composition. This results in a high flexibility of the chromatographic system because an optical resolution may be optimized to fit given requirements.

**Application note**

**Enantiomer separation of N-benzoyl-D,L-amino acids**

**Column:** EC 150/4 RESOLVOSIL BSA-7  
**Eluent:** 50 mmol/L phosphate buffer, pH 6.5 + 1% 1-propanol  
**Flow rate:** 0.70 mL/min  
**Detection:** UV, 225 nm

**Peaks:**  
 1. Serine  
 2. Alanine  
 3. Phenylalanine



S. Allenmark et al. in „Affinity Chromatography and Biological Recognition“ (I. Chaiken, M. Wilchek and I. Parikh, eds.), Acad. Press New York (1983), 259–260

MN Appl. No. 105450

Further application notes can be found in our application database in the internet under [www.mn-net.com/apps](http://www.mn-net.com/apps).

**Installation**

The column should be installed in the flow direction indicated on the column label. It is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments.

**Guard columns**

For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and / or loss of performance is observed.

**Sample**

Generally, the sample is dissolved in the eluent. Injection of aqueous samples can be made directly onto the column. But sample solutions should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution. A good resolution is achieved with sample concentrations below 0.2 µmol per injection.

**Eluent**

The RESOLVOSIL BSA-7 column is supplied with the eluent 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.5 + 2% 1-propanol. The column is compatible with mobile phase systems consisting of aqueous buffers with a pH between 5 and 8. Phosphate and borate buffers are adequate for this purpose. Avoid the use of pH extremes (< 5 or > 8). Retention and optical resolution can be regulated via pH, buffer strength (0.01–0.2 mol/L) and / or surface tension via small amounts of 1-propanol (0–5%) added as a co-solvent. Retention is always drastically reduced by as little as 1–2% 1-propanol and > 5% is not recommended. pH and ionic strength will affect retention in a way not generally predictable. To some extent the columns respond like reversed phase columns, but please note that the columns will not tolerate mobile phase systems containing acetonitrile or methanol because the protein will be denatured. Eluents should be always filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed.

**Flow rate and pressure**

Flow rate (recommended: 0.5–1.5 mL/min) influences the time required, the resolution and the column lifetime. It is limited by the back pressure, which should not exceed the maximum of 300 bar. We recommend controlling back pressure regularly. If a high pressure results from the use of the column at nominal flow rates, this usually indicates that some contaminants have become deposited on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

**Temperature**

Column temperatures from 10–40 °C are recommended. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. Variation of the temperature influences retention times and especially the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

**Detection**

UV, fluorescence, refractometric and electrochemical detectors can be used with the column. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

**Equilibration**

Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

**Column storage**

The original eluent 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.5 + 2% 1-propanol and cooling in a refrigerator is recommended for storage. Furthermore we suggest to add 0.01% sodium azide to the storage eluent to prevent potential growth of bacteria. During a chromatographic separation sodium azide should not be added to the eluent. For column storage be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. Under these circumstances rinse the column with approx. 10 column volumes of the eluent of storage at a flow rate of max. 0.2 mL/min.

**Troubleshooting**

The following outline describes the symptoms of performance loss and their cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Columns based on silica are robust and hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks.

Use the outline below to help determine the cause of a possible performance loss:

Symptom / Error / Cause	Prevention / Remedy
<b>Baseline drift</b> · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent · temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
<b>Broad peaks</b> · mixing and / or diffusion before / behind the column · too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
<b>Peak interference; too fast elution</b> too fast elution and / or insufficient separation by: · improper column temperature or flow rate · elution power of eluent is too high	optimize concerned parameter optimize eluent system
<b>Increasing back pressure; degradation of the separation performance</b> contamination of sorbent by: · particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system · denaturation of protein	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent never use acetonitrile or methanol; addition of propanol under 5% / replace column
<b>Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure</b> contamination by: · coating of sorbent surface with organic substances from improperly prepared eluent or samples · denaturation of protein	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration) never use acetonitrile or methanol; addition of propanol under 5% / replace column
<b>Double peaks (dead volume)</b> · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)  · dissolution of silica by too high pH value of eluent	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 / replace fittings consider pH range of column / replace column

**Column regeneration**

In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by regeneration of the phase. It is important, however, to locate the source of contamination before using the column for the analysis of samples again.

- Prepare fresh eluent:** Sometimes the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
- Cleaning of sorbent:** To remove contamination and for regeneration of phase rinse the column with pure water at a flow rate of 0.5 mL/min for approx. 4–5 h. Then change to the original working or storage conditions. An adequate indicator for a clean column is a constant baseline. At constant temperature you should observe less than 2–3 MAU drift during a running time of 5 min with an isocratic run.
- Column replacement:** The above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression or a denaturation of protein can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

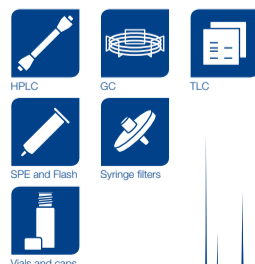
Length [mm]	Inner diameter [mm]:	Column volume [mL]			
		2	3	4	4.6
150		0.45	1.05	1.90	2.50
250		0.80	1.75	3.15	4.15

**Abstract**

To extend column lifetime, please keep in mind the following:

- As eluents aqueous buffer systems in the pH range of 5 to 8 are recommended (e.g., phosphate or borate buffer). The addition of up to 5% 1-propanol is possible. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
- Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
- Use a guard column for contaminated samples.
- The recommended flow rate is 0.5–1.5 mL/min.
- Adjust flow rate to keep column pressure below 300 bar.
- Store the column in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.5 + 2% 1-propanol in a refrigerator and add 0.01% sodium azide to the eluent.
- Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Please check the full range of MACHEREY-NAGEL chromatography products: [www.mn-net.com/chromatography](http://www.mn-net.com/chromatography)



... for applicative support please visit our application database with more than 3000 chromatography applications: [ChromaAppDB.mn-net.com](http://ChromaAppDB.mn-net.com)